

COLLOQUE 2017

MÉDECINE DE PRÉCISION ET THÉRAPEUTIQUES CIBLÉES :
RÉALITÉS ET PERSPECTIVES

**Thérapie génique :
réalisations cliniques et perspectives futures**

Salima Hacein-Bey-Abina, Paris

Les notes renvoient aux pages des références correspondantes.

PREMIÈRES ÉTAPES DU DÉVELOPPEMENT DES THÉRAPIES GÉNIQUES

Thérapie génique, un concept déjà ancien

L'idée d'utiliser du matériel génétique pour traiter certaines maladies a émergé il y a plusieurs décennies. Dès les années 60, il avait été clairement montré qu'un génome viral pouvait faire partie intégrante d'un génome cellulaire. Le clonage des gènes est devenu possible à la fin des années 70 et certains pionniers comme Théodore Friedman et Richard Roblin imaginaient déjà que la modification des rétrovirus pour leur faire transporter une information génétique pourrait permettre de corriger des anomalies génétiques. En 1969, Hurair Vasken Aposhian déclarait dans les congrès que « si le rôle d'un médicament est de restaurer la fonction d'un processus physiologique particulier, alors l'ADN devrait être considéré comme le médicament ultime ».

Années 1980-1990 : développement de vecteurs dérivés de virus et premiers essais de thérapie génique

Le développement des vecteurs rétroviraux s'est accéléré grâce à notre meilleure connaissance du cycle de vie des rétrovirus. Le début des années 80 a vu se développer des techniques permettant la modification de l'information génétique rétrovirale par l'addition de gènes potentiellement thérapeutiques. Parallèlement, le concept de thérapie génique par transfert de gènes *in vivo* ou *ex vivo* dans des cellules de mammifères est abondamment débattu. L'émergence de la thérapie génique s'accélère aussi grâce aux énormes progrès réalisés dans le domaine de la biologie des cellules souches et dans la manipulation des cellules souches hématopoïétiques.

Ainsi, à la fin des années 80, les bases des premiers essais cliniques de thérapie génique étaient posées et le tout premier transfert de gène clinique, impliquant l'insertion d'un gène marqueur dans les lymphocytes de patients cancéreux, est réalisé en 1989 par l'équipe de Steven Rosenberg du National Cancer Institute de Bethesda. Le premier essai de thérapie génique à visée thérapeutique a été mené en 1990 à Bethesda par le groupe de Michaël Blaese dans le traitement du Déficit Immunitaire Combiné Sévère par déficit en adénosine désaminase (ADA-SCID).

En 1994, le groupe mené par Alain Fischer, Marina Cavazzana et Salima Hacein-Bey-Abina de l'hôpital Necker, initie un traitement par transfert de gène dans les cellules souches hématopoïétiques pour le traitement du SCID lié au chromosome X, aussi appelé SCID-X1^[1]. Cet essai clinique a permis d'apporter la preuve de concept de l'efficacité du transfert de gène dans les cellules souches des patients à l'aide d'un vecteur rétroviral. Depuis lors, un grand nombre d'essais cliniques concernant les maladies héréditaires, mais également les

cancers ou les infections virales chroniques comme l'infection par le VIH, a été mené. La plupart font appel à des vecteurs dérivés de virus tels que rétrovirus, lentivirus, adénovirus ou virus adéno-associé (ou AAV, pour Adeno-Associated Virus) pour transporter un gène à l'intérieur de la cellule cible. Les cellules cibles sont transduites par le vecteur viral et le matériel génétique du vecteur est inséré dans la cellule cible. Les protéines fonctionnelles sont alors produites à partir du gène thérapeutique, ce qui entraîne le retour de la cellule à un état normal.

MALADIES AFFECTANT LE SYSTÈME LYMPHO-HÉMATOPOÏÉTIQUE

Les cellules souches hématopoïétiques ont très vite représenté une cible privilégiée pour le transfert de gènes *ex vivo*. Il est en effet rapidement apparu qu'y intégrer un gène thérapeutique de façon stable permettrait de garantir une correction définitive de la maladie grâce à la capacité d'auto-renouvellement de ces cellules.

Caractéristiques du SCID-X1

Le SCID-X1 est dû à un blocage très précoce de la différenciation des lymphocytes T et NK (*Natural Killer*) causé par des mutations du gène codant pour la chaîne gamma commune (γ_c) à plusieurs récepteurs de cytokines, dont l'IL 7 et l'IL 15 qui interviennent dans le développement de ces lymphocytes.

Sur le plan clinique, le défaut de ces lymphocytes se manifeste par des infections récurrentes sévères létales et par la nécessité de maintenir les jeunes patients dans des chambres stériles (bébés-bulles). Le traitement conventionnel consiste en une greffe de moelle osseuse allogénique lorsqu'il existe un donneur intrafamilial possédant les mêmes antigènes tissulaires d'histocompatibilité (HLA, pour *Human Leukocyte Antigen*). Cette situation est malheureusement peu fréquente et la greffe de moelle osseuse provenant d'un donneur haplo-identique donne des taux médiocres de survie à 5 ans.

Premier essai de thérapie génique du SCID-X1

Le SCID-X1 constituait un bon modèle pour le développement d'une thérapie par transfert de gène : il n'existait pas de traitement totalement satisfaisant chez les patients sans donneur HLA identique, ses bases génétiques sont connues, les progéniteurs T ont une capacité de prolifération très importante et la correction de l'expression de la chaîne γ_c devrait leur conférer un avantage sélectif de prolifération.

Le transfert de gène consiste à prélever un échantillon de moelle osseuse sur le jeune patient, à introduire *ex vivo* le gène thérapeutique dans des cellules souches à l'aide d'un vecteur intégratif, puis à réinjecter au patient ces cellules souches modifiées afin qu'il puisse développer une immunité. Le vecteur de première génération utilisé en 1999 était dérivé du rétrovirus de Moloney (ou virus de la leucémie murine). Dix patients, âgés de moins d'un an, ont été traités. Le traitement a rétabli une immunité chez neuf des dix sujets traités, mais quatre d'entre eux développèrent une leucémie aiguë lymphoblastique T (LAL-T) et un en mourut^[1].

Ce premier essai nous a enseigné qu'il existe une corrélation positive entre l'intensité de la reconstitution lymphocytaire T et la taille des greffons génétiquement modifiés^[2]. Chez les patients qui ont développé une leucémie, la chimiothérapie n'a pas éradiqué les progéniteurs T modifiés et les taux de lymphocytes T ont pu être reconstitués. Il faut souligner que le répertoire représenté par la diversité des lymphocytes T, était normal et comparable à celui de la population polyclonale d'un individu sain.

Analyse des cas de LAL-T

Le vecteur rétroviral exprimant l'ADN complémentaire de la chaîne γ_c avait donc permis de rétablir l'immunité chez la plupart des patients, mais au prix d'une LAL-T induite chez quatre patients sur neuf. Ces cas se sont déclarés entre 31 et 68 mois après la thérapie génique. L'analyse a montré que le vecteur viral était intégré dans, ou à proximité, de proto-oncogènes avec une prédilection pour le proto-oncogène LMO2 ainsi que pour

le proto-oncogène CCND2, des gènes classiquement impliqués dans la LAL-T. Nous avons montré que le mécanisme d'activation de ces proto-oncogènes mettait en jeu le promoteur viral situé à proximité^[2, 3].

Second essai de thérapie génique du SCID-X1

La première génération de vecteurs viraux conservait le promoteur viral intact, ce qui avait été à l'origine de son effet transactivateur sur les oncogènes à proximité desquels le vecteur s'était inséré. Il était clair que, désormais, il faudrait améliorer ces vecteurs de façon à en augmenter la sécurité. En conséquence, nous avons évalué l'efficacité et l'innocuité d'un vecteur rétroviral sécurisé (SIN, pour *Self Inactivating*), dans lequel les séquences potentialisatrices du promoteur viral avaient été délétées.

Nous avons initié un essai multicentrique (France, Angleterre et Etats-Unis) incluant neuf garçons atteints de SCID-X1^[4]. Tous les patients ont reçu des cellules CD34+ dérivées de la moelle osseuse, transduites à l'aide du vecteur SIN- γ . Huit patients ont montré une reconstitution lymphocytaire T fonctionnelle permettant une résolution des infections (cf. Fig. 1). L'analyse du profil d'insertion rétrovirale a révélé une diminution significative du nombre de vecteurs rétroviraux insérés au sein (ou à proximité) des proto-oncogènes lymphoïdes par rapport au vecteur utilisé dans le premier essai de thérapie génique du SCID-X1 (cf. Fig. 2). Les patients étaient toujours en bonne santé sept ans après la thérapie et aucun cas de leucémie ne s'est déclaré.

Figure 1. Evolution dans le temps du nombre de lymphocytes CD3+, CD4+ et CD8+ ^[4]

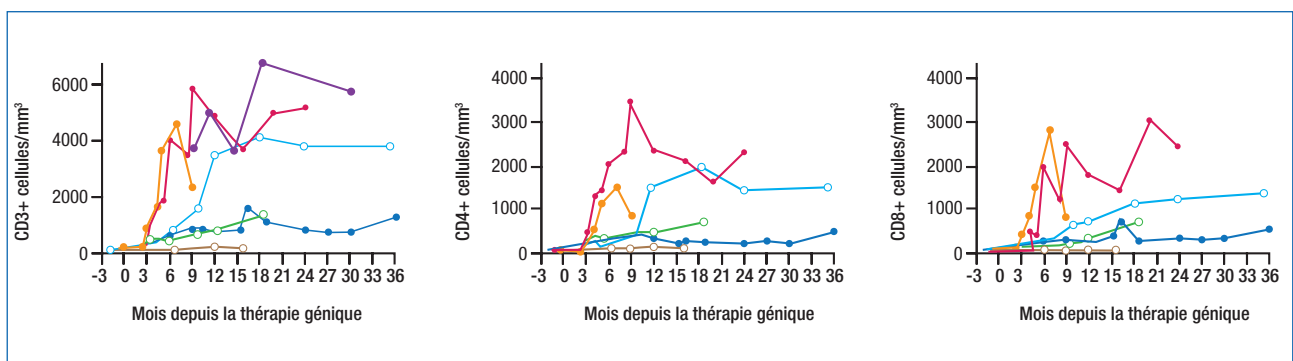
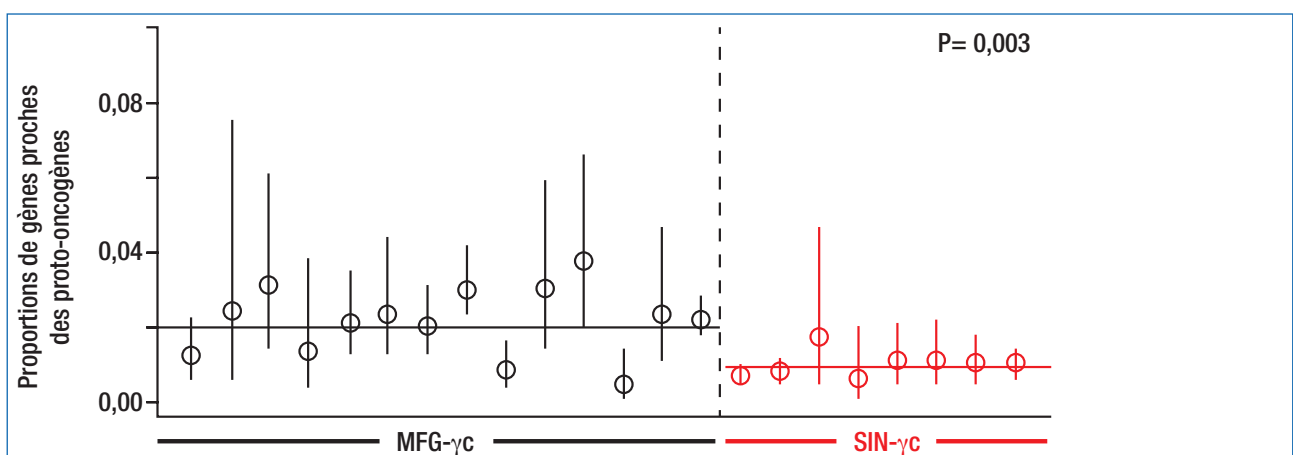


Figure 2. Comparaison des fréquences des sites d'intégration proches des proto-oncogènes^[4]



Chaque point représente un patient individuel ayant bénéficié d'une thérapie génique. $P = 0,003$ porte sur la comparaison entre les essais sur une base par patient (chaque patient a été analysé comme un seul point de donnée). (MFG- γ) : vecteur de la leucémie murine de Moloney de première génération exprimant l'ADN complémentaire de γ ; SIN- γ : vecteur rétroviral auto-inactivé (SIN) avec délétion des séquences virales activatrices.

ELARGISSEMENT DES APPLICATIONS CLINIQUES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE DES CELLULES SOUCHES HÉMATOPOÏÉTIQUES

Un grand nombre d'essais cliniques réalisés au cours des deux dernières décennies a fait appel aux vecteurs intégratifs rétroviraux ou (plus récemment) lentiviraux sécurisés évoqués ci-dessus. Les résultats n'ont pas toujours été prometteurs, mais nous citerons les travaux de nos collègues italiens à Milan qui ont mené avec succès des essais dans le traitement des déficits immunitaires, dont le déficit en adénosine désaminase^[5]. Le syndrome de Wiskott-Aldrich a été abordé par plusieurs équipes, dont la nôtre, à l'Hôpital Necker, en collaboration avec Généthon, et une efficacité clinique a pu être montrée dans cet essai après transfert du gène WASP dans les cellules hématopoïétiques des patients^[6, 7]. Enfin, plusieurs équipes, dont la nôtre (à l'Hôpital Necker), ont entrepris de traiter les bêta-thalassémies par thérapie génique, avec des résultats très encourageants.

APPLICATIONS CLINIQUES DES THÉRAPIES GÉNIQUES CIBLANT LE FOIE

Une cible privilégiée pour la production de protéines thérapeutiques

Il a été imaginé qu'après transduction, les hépatocytes pourraient être capables de fabriquer et de libérer dans la circulation générale des protéines capables, par exemple, de traiter des déficits comme le déficit en facteur IX.

Les hépatocytes étant des cellules différenciées à longue durée de vie, il n'était pas nécessaire de choisir une stratégie basée sur l'utilisation d'un vecteur intégratif. Le choix du vecteur s'est porté sur un vecteur non intégratif dérivé de virus AAV. Ce type de vecteur présente l'avantage de manifester un tropisme pour le foie et demeure dans les hépatocytes sous forme épisodale. Cette famille de vecteurs est très utilisée dans les protocoles de thérapie génique *in vivo* ciblant le cerveau, la rétine, le muscle et le foie.

Thérapie génique dans le traitement de l'hémophilie

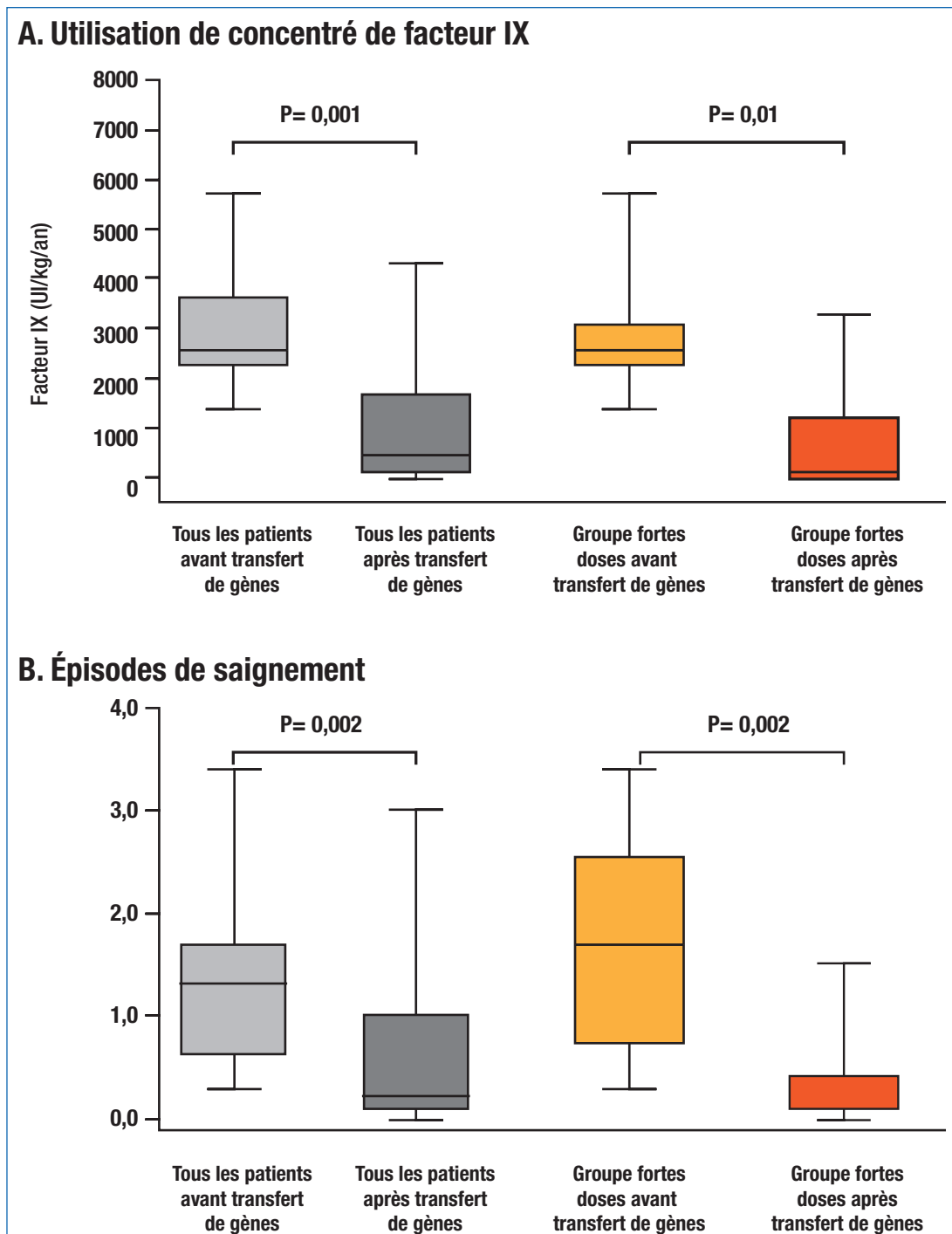
L'hémophilie B est le deuxième trouble hémostatique congénital le plus fréquent. Elle est caractérisée par des saignements fréquents au niveau des articulations entraînant une fibrose cartilagineuse, une perte de l'espace articulaire et une évolution parfois fatale. Le traitement actuel de l'hémophilie consiste à administrer des concentrés de facteurs de coagulation recombinants ou des dérivés du plasma.

Ici encore, l'histoire des essais cliniques évaluant la thérapie génique dans le traitement de l'hémophilie est très longue. Le premier essai dans ce domaine a été publié en 2006^[8]. Dans ce travail, les investigateurs ont perfusé un AAV de sérotype 2 exprimant le facteur IX humain dans l'artère hépatique de sept patients. L'intervention a été bien tolérée et l'expression du facteur IX a augmenté très rapidement. Cependant, sa durée d'expression à un niveau thérapeutique s'est limitée à environ 8 semaines en raison de la destruction des hépatocytes transduits par la réponse immune initiée contre les protéines de capsid de l'AAV.

Un essai ultérieur, mené par Nathwani et Davidoff à Londres, a fait appel à un autre sérotype d'AAV, l'AAV8, qui est caractérisé par un tropisme pour le foie, plus important que celui de l'AAV2, et dont le design a été amélioré afin d'augmenter le potentiel d'expression du transgène^[9]. On sait que l'immunogénicité est proportionnelle à la dose de vecteur injectée, et donc que plus un vecteur est efficace moins il est nécessaire d'augmenter les doses, ce qui a probablement contribué au succès de cet essai. De plus, les investigateurs ont réalisé une immunosuppression transitoire en administrant des corticoïdes très tôt, au moment de l'initiation de l'essai.

Une perfusion intraveineuse unique de ce vecteur chez les 10 patients atteints d'hémophilie B sévère a entraîné une augmentation dose-dépendante du facteur IX circulant, à un niveau compris entre 1 et 6 % de la valeur normale. Dans le groupe à dose élevée, l'augmentation moyenne du taux de facteur IX a été de 5,1 %, ce qui a permis une réduction de plus de 90 % des épisodes de saignement et de l'utilisation de concentrés de facteur IX prophylactiques (cf. Fig. 3).

Figure 3. Effet du transfert de gène sur l'administration du concentré de facteur IX et le nombre d'épisodes hémorragiques avant et après le transfert de gène^[9]



Comparaison de la quantité moyenne de concentré de facteur IX administrée (A) et du nombre d'épisodes hémorragiques (B) chez les 10 patients étudiés durant l'année précédant le transfert de gène et durant l'année suivant le transfert de gène.

APPLICATIONS CLINIQUES DE LA THÉRAPIE GÉNIQUE DANS LE CANCER

La thérapie génique est considérée comme un traitement efficace pour les maladies héréditaires mais, à ce jour, le plus grand nombre d'études cliniques de transfert de gènes s'applique au traitement du cancer, probablement en raison de la gravité de la maladie et/ou du grand nombre de patients atteints.

Thérapies basées sur l'utilisation des virus oncolytiques

Les premiers essais cliniques de thérapie génique dans le cancer faisaient appel, parfois avec une grande efficacité, à l'utilisation de virus oncolytiques. Les virus oncolytiques induisent spécifiquement la mort des cellules tumorales. Ils constituent une option de traitement émergente pour de nombreux types de cancer et ont récemment fait l'objet de recherches approfondies visant à développer leur potentiel thérapeutique. Le but ultime est de concevoir un virus capable de se répliquer efficacement au sein de l'hôte, ciblant et lysant spécifiquement les cellules tumorales et induisant de façon durable et robuste une immunité spécifique vis-à-vis de la tumeur. Il existe un certain nombre de virus qui sont soit naturellement antitumoraux, soit qui peuvent être modifiés pour cibler spécifiquement et éliminer les cellules tumorales^[10].

Immunothérapies anticancéreuses : les cellules CAR-T

Il nous faut insister sur un saut technologique majeur qui s'est produit ces dernières années avec l'utilisation de l'immunothérapie basée sur l'injection de lymphocytes T autologues modifiés pour leur faire exprimer un récepteur particulier, dit « chimérique » (CAR, pour *Chimeric Antigen Receptor*), leur permettant de reconnaître spécifiquement les cellules tumorales.

Son principe est d'agir en redirigeant les cellules T d'un patient pour reconnaître un antigène tumoral spécifique et tuer la cellule qui l'exprime. Dans la plupart des cas, la transduction fait appel à un vecteur lentiviral codant pour un CAR ciblant le CD19 de la leucémie aiguë lymphoblastique. En pratique, des globules blancs du patient sont isolés, les cellules T autologues sont transduites pour exprimer un récepteur CAR, puis elles sont ré-administrées au patient par injection. Les lymphocytes T peuvent alors se multiplier, « chasser » et détruire les cellules cancéreuses.

Si les premiers CAR n'ont permis qu'une réponse limitée dans les essais cliniques en raison d'une persistance limitée, les CAR de nouvelle génération, dotés de domaines de co-stimulation supplémentaires, ont donné des résultats impressionnants^[11]. La thérapie cellulaire CAR-T est ainsi reconnue comme une technologie d'avant garde qui s'est montrée particulièrement efficace dans le traitement de patients atteints de leucémies ou de lymphomes réfractaires ou récidivants. Plus de 200 études cliniques sur les CAR-T ont été mises en place jusqu'à présent, dont la plupart dans le traitement des tumeurs malignes à cellules B à l'aide de CAR-T spécifiques du CD19. Les premiers succès ont été publiés en 2011 par l'équipe de l'université de Pennsylvanie de Carl June^[12, 13].

Un nombre croissant d'études s'intéresse également aux tumeurs solides et de nouvelles études sur l'immunothérapie du cancer explorent actuellement le potentiel des lymphocytes NK manipulés afin de leur faire exprimer un CAR d'intérêt.

DÉVELOPPEMENT DE TECHNOLOGIES D'ÉDITION DE GÈNES

Des progrès considérables ont été effectués ces dernières années dans d'autres domaines de biotechnologies comme l'édition du génome. Le CRISPR-Cas9, un ARN bactérien à répétitions palindromiques courtes, groupées et régulièrement espacées (CRISPR), associé à un système de nucléases (Cas), est très utilisé pour la correction des mutations de cellules eucaryotes ou pour la conception de cellules T utilisables dans l'immunothérapie anticancéreuse.

La première étude clinique utilisant la technologie du CRISPR-Cas9 a été menée en Chine en 2016 chez des patients atteints de cancer du poumon^[14]. Une vingtaine d'essais sont actuellement en cours de préparation, majoritairement en Chine.

Il faut souligner que la précision de cette technologie est déterminante et que le risque d'édition « hors cible », c'est-à-dire modifiant d'autres gènes que ceux ciblés, soulève des préoccupations en raison de la possibilité

d'événements indésirables graves, de cancers notamment. La technique du CRISPR-Cas9 est très prometteuse, mais il faudra une technologie de distribution efficace pour des applications larges et performantes avec une évaluation précise de la toxicité hors cible.

CONCLUSION

La thérapie génique a commencé avec l'idée simple que remplacer un gène défectueux par une copie fonctionnelle pourrait permettre de guérir une maladie. La route a été longue pour traduire ce concept en réalité. Les récentes études de thérapie génique ont montré des bénéfices considérables. Ces résultats cliniques, avec : 1) l'amélioration des vecteurs viraux utilisés pour le transfert de gène ; 2) l'application du concept des immunothérapies anti-cancer comme nouvelle option thérapeutique puissante pour un nombre croissant de types de cancers ; 3) le développement des technologies de correction des gènes, contribuent à la revitalisation du domaine de la thérapie génique. Le futur développement clinique de ces thérapies cellulaires sera garanti par la création de plateformes technologiques évolutives qui : 1) favorisent différents niveaux de production de qualité pharmaceutique ; 2) s'adaptent à la capacité croissante de cibler l'intégration des gènes. Ces nouveaux produits de thérapie génique/cellulaire pourront tenir la promesse de traitements efficaces et sûrs pour des maladies actuellement incurables et seront accessibles au plus grand nombre de patients.

BIBLIOGRAPHIE (les références soulignées renvoient aux abstracts correspondants sur PubMed)

1. Cavazzana-Calvo M*, Hacein-Bey S*, de Saint Basile G, et al. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. Science 2000;288:669-72.*Contributed equally
2. Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. J Clin Invest 2008;118:3132-42.
3. Hacein-Bey-Abina S*, Von Kalle C*, Schmidt M, et al. LMO2-associated clonal T cell proliferation in two patients after gene therapy for SCID-X1. Science 2003;302:415-9. .*Contributed equally
4. Hacein-Bey-Abina S*, Pai SY*, Gaspar HB, et al. A modified γ -retrovirus vector for X-linked severe combined immunodeficiency. N Engl J Med 2014;371:1407-17. .*Contributed equally
5. Aiuti A, Cattaneo F, Galimberti S, et al. Gene therapy for immunodeficiency due to adenosine deaminase deficiency. N Engl J Med 2009;360:447-58.
6. Aiuti A, Biasco L, Scaramuzza S, et al. Lentiviral hematopoietic stem cell gene therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. Science 2013;341:1233151.
7. Hacein-Bey Abina S, Gaspar HB, Blondeau J, et al. Outcomes following gene therapy in patients with severe Wiskott-Aldrich syndrome. JAMA 2015;313:1550-63.
8. Manno CS, Pierce GF, Arruda VR, et al. Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. Nat Med 2006;12:342-7.
9. Nathwani AC, Reiss UM, Tuddenham EG, et al. Long-term safety and efficacy of factor IX gene therapy in hemophilia B. N Engl J Med 2014;371:1994-2004.
10. Howells A, Marelli G, Lemoine NR, Wang Y. Oncolytic viruses-interaction of virus and tumor cells in the battle to eliminate cancer. Front Oncol 2017;8:7:195.
11. Sadelain M. CAR therapy: the CD19 paradigm. J Clin Invest 2015;125:3392-400.
12. Porter DL, Levine BL, Kalos M, Bagg A, June CH. Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia. N Engl J Med 2011;365:725-33.
13. Kalos M, Levine BL, Porter DL, et al. T cells with chimeric antigen receptors have potent antitumor effects and can establish memory in patients with advanced leukemia. Sci Transl Med 2011;3:95ra73.
14. Kim JS. Genome editing comes of age. Nat Protoc 2016;11:1573-8.